

10/540228  
PCT/1803/06205  
30.12.03

REC'D 28 JAN 2004

WIPO

PCT

# BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION****COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 29 JUL. 2003

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*03

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire


DB 540 • B / 210502

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>27 DEC 2002</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0216810</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>27 DEC. 2002</b>		<b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CMR INTERNATIONAL 10, rue de Florence 75008 PARIS	
<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____	
ou demande de certificat d'utilité initiale		N° _____ Date _____	
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/> N° _____ Date _____	
<b>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b>			
"NOUVELLE UTILISATION D'UN AGONISTE DU GnRH"			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation _____ Date _____ N° _____ Pays ou organisation _____ Date _____ N° _____ Pays ou organisation _____ Date _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		LOUMAYE	
Prénoms		Ernest	
Forme juridique			
N° SIREN		_____	
Code APE-NAF		_____	
Domicile ou siège	Rue	Domaine de Quincy Route de l'église	
	Code postal et ville	74140 MASSONGY	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		BELGE	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page

REMISE DES PIÈCES  
DATE **27 DEC 2002**  
LIEU **75 INPI PARIS**  
N° D'ENREGISTREMENT **0216810**  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 210502

<b>3 MANDATAIRE (obligatoire)</b>		
Nom		
Prénom		
Cabinet ou Société		CMR INTERNATIONAL
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	10, rue de Florence
	Code postal et ville	75 008 PARIS
	Pays	FRANCE
N° de téléphone (facultatif)		33 1 42 94 07 30
N° de télécopie (facultatif)		33 1 42 94 07 01
Adresse électronique (facultatif)		contact@cmr-international.com
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input checked="" type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>
Mandataire		

La présente invention concerne l'utilisation d'un agoniste d'une hormone hypothalamique dans la préparation d'un agent pharmaceutique pour le support de la phase lutéale lors des traitements de la stérilité chez un mammifère femelle et plus spécialement chez la femme.

Le cycle menstruel de la femme se compose de trois phases fonctionnellement distinctes (Yen S. and Jaffe R. 1986, Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology and Clinical Management, W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA, USA.) :

10

1) La *Phase Folliculaire* durant laquelle on assiste au recrutement de plusieurs follicules ovariens, suivie de la sélection et de la dominance d'un follicule. Cette phase dure environ 12 jours et est caractérisée par une montée progressive des taux sanguins d'oestradiol et des taux de progestérone bas. Cette phase est le résultat de la sécrétion par l'hypophyse d'une hormone appelée FSH ("Follicle Stimulating Hormone").

2) Une *Phase péri-ovulatoire* (aussi appelée *ovulation*) qui dure environ 48 heures et est caractérisée par une montée soudaine et importante des taux sanguins de LH ("Luteinizing Hormone", une autre hormone sécrétée par l'hypophyse). Cette phase se termine par la formation d'un "corps jaune". Cette phase peut être elle-même divisée en une séquence d'évènements qui incluent:

20

- *La maturation finale du follicule:*

- Le changement de la stéroïdogénèse du follicule qui passe d'une production dominante en oestradiol vers une production dominante en progestérone.

- La reprise de la méiose de l'ovocyte.

25

- *L'ovulation:*

- Le follicule se rompt et libère l'ovocyte.

- *La formation du corps jaune*

- Le follicule vide se ré-organise pour former le corps jaune.

30

3) La *phase lutéale* durant laquelle le corps jaune sécrète de vastes quantités de progestérone, ainsi que des quantités moindres de 17 OH-progesterone, oestradiol, oestrone et relaxine. Cette phase dure environ 14 jours et est dépendante d'une sécrétion adéquate de LH par l'hypophyse.

Durant la phase lutéale la progestérone agit de concert avec les oestrogènes sur les cellules endométriales pour fournir un environnement favorable à l'implantation de l'embryon.

- 5 Une phase lutéale inadéquate peut être le résultat d'une déficience plus ou moins sévère de la sécrétion de progestérone par le corps jaune. Dans ce cas, les taux sanguins de progestérone seront inférieurs à 10 ng/mL. La déficience de la phase lutéale peut aussi être le résultat d'un raccourcissement anormal de cette phase (par ex. moins de 11 jours). Les conséquences cliniques d'une insuffisance lutéale sont l'échec de l'implantation de  
10 l'embryon, et la possibilité de fausse couche si la grossesse à, malgré tout, débuté (Yen S. and Jaffe R. 1986, Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology and Clinical Management, W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA, USA.).

- 15 La déficience de la phase lutéale est une caractéristique habituelle des cycles résultant d'une stimulation pharmacologique de la croissance folliculaire pour le traitement de la stérilité. Ceci a été observé tant chez des patientes non-ovulantes qui entreprennent un traitement d'induction de l'ovulation, que chez des patientes ovulantes entreprenant une stimulation d'un développement folliculaire multiple dans le but de pratiquer une insémination intra-utérine (IUI) ou une Assistance Médicale à la Procréation (AMP) telle  
20 qu' une fécondation *in vitro* (IVF) ou une insémination intra cytoplasmique (ICSI). Cette déficience de la phase lutéale a été observée dans les cycles stimulés par le citrate de clomiphène, la FSH/hMG, la FSH/hMG associée à un pré-traitement par un agoniste de la GnRH ("Gonadotrophin releasing hormone") ou associé à un traitement par antagoniste de la GnRH (Beckers NG *et al.* 2002, Comparison of non-supplemented luteal phase  
25 characteristics following the administration of r-hCG, r-hLH or GnRH agonist to induce final oocyte maturation in in vitro fertilisation patients. Hum. Reprod. 17: Abstract Book 1; O-157.; Pritts E.A. and Atwood A.K. 2002, Luteal support in infertility treatment: a meta-analysis of the randomized trials. Hum Reprod 17: 2287-2299). La déficience de la phase lutéale est principalement attribuée aux taux supra-physiologiques d'oestradiol  
30 résultant de la stimulation pharmacologique des ovaires.

Le support pharmacologique de la phase lutéale, aussi appelé "supplémentation lutéale" est une pratique obligatoire dans les traitements de la stérilité afin d'augmenter significativement le taux d'implantation des embryons, le taux de grossesse, et de réduire le taux de fausse-couches (Pritts E.A. and Atwood A.K. 2002, Luteal support in infertility treatment: a meta-analysis of the randomized trials. Hum Reprod 17: 2287-2299).

Deux médicaments sont couramment utilisés pour le support de la phase lutéale. Le premier est la progestérone naturelle, le second est l'hormone chorionique gonadotrophine humaine (hCG). La progestérone est administrée par voie intra-musculaire ou par voie vaginale. L'objectif poursuivi est d'augmenter les taux sanguins en progestérone. L'hCG est administrée par voie sous-cutanée ou intra-musculaire. L'hCG est un analogue naturel de la LH et stimule donc le corps jaune à sécréter de la progestérone.

Dans les traitements pour AMP, un support lutéal par hCG ou progestérone administrée en intra-musculaire augmentent significativement les taux de grossesses (Pritts E.A. and Atwood A.K. 2002, Luteal support in infertility treatment: a meta-analysis of the randomized trials. Hum Reprod 17: 2287-2299). La probabilité relative d'obtenir une grossesse avec l'hCG en comparaison avec l'absence de support lutéal est de 2.72 (CI: 1.56-4.90;  $p < 0.05$ ) et celui de la progestérone en intra-musculaire est de 2.38 (CI: 1.36-4.27;  $p < 0.05$ ). La progestérone administrée par voie vaginale, bien que probablement supérieure à l'absence de support lutéal n'est pas aussi efficace que la progestérone administrée par voie intra-musculaire. Pour cette voie d'administration la probabilité relative d'obtenir une grossesse est de 2.11 avec un C.I. of 0.95-4.67 (NS). En outre, la comparaison de l'efficacité relative de la progestérone administrée par voie intra-musculaire par rapport à la voie intra-vaginale est de 1.33 avec un C.I. of 1.02 -1.75, en faveur de la voie intra-musculaire ( $p < 0.05$ ) (Pritts E.A. and Atwood A.K. 2002, Luteal support in infertility treatment: a meta-analysis of the randomized trials. Hum Reprod 17: 2287-2299).

30

Les inconvénients de la progestérone administrée par voie intra-musculaire sont que (i) les injections sont quotidiennes pendant plus de deux semaines, (ii) la solution est huileuse et donc les injections sont douloureuses; (iii) ces injections peuvent déclencher des réactions

inflammatoires et même des abcès et (iv) il n'est pas facile pour une patiente de s'auto-injecter en intra-musculaire. Ces injections demandent donc le plus souvent une assistance para-médicale.

5

Les inconvénients de l'hCG comme support lutéal sont que (i) son utilisation est associée à une augmentation d'une complication rare mais potentiellement létale appelée syndrome d'hyperstimulation ovarienne, (ii) son administration doit se faire par injection, (iii) il produit des tests de grossesse faussement positif retardant de ce fait le diagnostic de la grossesse, (iv) l'hCG est un produit biologique extrait d'urine ou de milieux de culture contenant des protéines animales, et donc présente un risque au moins théorique, de contamination par des particules infectieuses (ex. Virus ou prions)(Reichl H *et al.*, 2002 Prion transmission in blood and urines: what are the implications for recombinant and urinary-derived gonadotropins ? Hum Reprod 17: 2501-2508). Pour l'ensemble de ces raisons, beaucoup de médecins restreignent l'usage de l'hCG comme support de la phase lutéale.

La présente invention vise à éviter ces inconvénients, en mettant à disposition une nouvelle utilisation d'un agoniste d'une hormone hypothalamique, en l'occurrence un agoniste du GnRH, dans la préparation d'un agent pharmaceutique pour le support de la phase lutéale lors des traitements de la stérilité chez un mammifère femelle et plus spécialement la femme. Conformément à l'invention, cette utilisation est caractérisée en ce que ledit agent pharmaceutique est adapté à une utilisation pour le support de la phase lutéale après une ovulation spontanée ou après stimulation des phases de croissance folliculaire, de maturation finale des follicules et d'ovulation par un ou plusieurs agents thérapeutiques.

Dans la description détaillée, qui va suivre, de la mise en œuvre de l'invention, les termes suivants correspondent aux définitions indiquées ci-dessous :

30

Le terme "*Administration*" signifie donner un médicament à une patiente.

Le terme "*Follicule*" se réfère à une structure dans l'ovaire qui contient et nourrit un ovule (ovocyte). L'ovule est le gamète femelle ou cellule germinale femelle. Dans sa

phase finale de développement, le follicule devient antral. Ceci veut dire qu'il a en son centre une cavité remplie d'un liquide. A ce stade de développement, la croissance du follicule est dépendante de l'hormone hypophysaire FSH. La croissance d'un follicule peut être suivie en mesurant le diamètre de cette cavité par échographie. Typiquement, un follicule pré-ovulatoire mesure entre 16 et 24 mm (Balasch J. 2001. Inducing follicular development in anovulatory patients and normally ovulating women: current concepts and the role of recombinant gonadotropins. In Textbook of Assisted Reproductive Techniques eds D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, Z. Shoham, Martin Dunitz, 2001 pp 425-446).

"Complexe cumulus-ovocyte" se réfère à l'ovule entouré d'une matrice mucineuse. L'ovule sera libéré du cumulus après l'ovulation, lors de la fécondation. C'est grâce à une activité enzymatique nommée hyaluronidase et sécrétée par les spermatozoïdes que ce phénomène s'opère.

Le terme "*Phase Péri-Ovulatoire*" couvre plusieurs événements qui résultent de l'augmentation importante et soudaine des taux de LH à mi-cycle:

- "*Maturation folliculaire finale*" se réfère aux modifications entreprises par le follicule et le complexe cumulus-ovocyte lors de la montée pré-ovulatoire de LH, mais avant la rupture effective du follicule et la libération de l'ovule. Brièvement ces modifications incluent: (i) un changement de la stéroïdogénèse des cellules de la granuleuse du follicule d'une sécrétion préférentielle en oestrogènes vers une sécrétion préférentielle en progestérone, (ii) la reprise de la méiose de l'ovocyte qui transforme l'ovocyte d'un stade de vésicule germinale en un stade de métaphase II.
- "*Ovulation*" se réfère au phénomène par lequel l'ovocyte quitte l'ovaire. L'ovulation consiste en une protrusion du follicule à la surface de l'ovaire, suivi de la rupture de ce follicule et de l'expulsion du complexe cumulus-ovocyte.
- "*Formation du Corps Jaune*" se réfère à la ré-organisation du follicule vide après l'expulsion du complexe cumulus-ovocyte et du liquide folliculaire. Les cellules de la granuleuse et de la thèque (les deux populations cellulaires principales du follicule) vont se lutéiniser et devenir un organe sécréteur de progestérone.



Il faut noter que dans le jargon médical le terme “*ovulation*” est utilisé tout autant pour définir l’ensemble des phénomènes péri-ovulatoires que la rupture folliculaire elle-même.

5

Le terme de “*Phase Lutéale*” se réfère à la durée de vie du corps jaune lors d’un cycle spontané sans conception. Cette durée est en moyenne de 14 jours. Son début est défini par le jour suivant le pic de LH pré-ovulatoire et sa fin est définie par le jour précédant la survenue des menstruations.

10

Le terme “*Support Lutéal*” définit toute intervention thérapeutique durant la phase lutéale visant à renforcer ou à substituer la fonction du corps jaune afin d’augmenter les chances d’implantation de l’embryon et de favoriser le développement précoce de la grossesse. Actuellement, les deux agents thérapeutiques utilisés pour le support lutéal sont l’hCG et la progestérone naturelle.

15

Le terme “*Assistance Médicale à la Procréation*” (AMP) comprend les techniques médicales visant à favoriser la conception et le début de la grossesse. Ces méthodes impliquent, par définition, une manipulation médicale des gamètes mâles (spermatozoïdes) et/ou femelles (ovocytes). Les méthodes d’AMP les plus couramment utilisées consistent d’abord à stimuler une croissance folliculaire multiple par un agent thérapeutique, puis à favoriser la fécondation par une insémination intra-utérine (IUI) ou une insémination *in vitro* (IVF). L’IUI consiste à introduire à l’aide d’un cathéter une suspension de spermatozoïdes mobiles dans la cavité utérine. L’IVF consiste à d’abord récupérer les ovocytes dans l’ovaire par aspiration, puis à les mettre en contact avec les spermatozoïdes *in vitro* afin que la fécondation s’opère naturellement. ICSI, qui est une variante technique de l’IVF, consiste à prélever les ovocytes comme pour l’IVF, mais la fécondation est réalisée par micro-injection d’un spermatozoïde dans l’ovocyte. Les embryons résultant de IVF et de l’ICSI sont cultivés pendant quelques jours au laboratoire avant d’être replacés dans l’utérus de la patiente ou être congelés pour remplacement ultérieur.

20

25

30

Le terme “*Gonadotrophin releasing hormone (GnRH)*” se réfère à une hormone hypothalamique peptidique sécrété par une région du cerveau appelée “hypothalamus”. Ce

déca-peptide joue un rôle central dans les mécanismes de reproduction de nombreuses espèces, y compris celle des mammifères et en particulier l'espèce humaine. GnRH va agir sur la glande hypophyse ou il se lie à un récepteur membranaire spécifique, qu'il active.

5 L'activation de ce récepteur entraîne une sécrétion immédiate de LH et FSH dans le sang.

Le terme "*Agoniste du GnRH*" se réfère à des analogues synthétiques ou naturels du GnRH natif qui possèdent une capacité à activer les récepteurs du GnRH. Ces analogues peuvent être de nature peptidique ou non-peptidique (peptido-mimétique).

10

Le terme "*Follicle Stimulating Hormone (FSH)*" se réfère à une hormone hypophysaire qui stimule la croissance des follicules ovariens. FSH fait partie de la famille hormonale des gonadotrophines. Pour usage thérapeutique, la FSH peut être produite par extraction de fluides biologiques riches en FSH telles que les urines de femmes  
15 ménopausées. Elle peut aussi être extraite de milieux de culture dans lesquels des cellules génétiquement modifiées produisent de la FSH humaine (ex: recombinaison génétique de l'ADN des cellules CHO ; Loumaye E., Howles C. 1999 Superovulation of Assisted Conception: The new Gonadotrophins. In Textbook of In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction. P. Brinsden Eds, Parthenon Publishing.). Pour cette invention, le terme FSH  
20 réfère à un mélange de plusieurs isoformes de la FSH, ou d'une isoforme particulière qui peut être naturellement disponible ou modifiée par un procédé technique. Le terme FSH se réfère aussi à des molécules hybrides ou chimériques, à des peptides ou des peptido-mimétiques qui possèdent des propriétés de type FSH, par activation du récepteur de la FSH ou par interaction biochimique dans les mécanismes post-récepteurs des cellules  
25 cibles de la FSH. Le terme FSH couvre aussi des préparations de type hMG (*human menopausal gonadotrophins*) ou recombinante dans lesquelles la FSH est associée à de petites quantités de LH et/ou d'hCG.

Le terme "*Selective estrogen receptors modulators (SERM)*" se réfère à tout  
30 composé chimique ou polypeptide qui agit totalement ou partiellement comme un activateur des récepteurs aux oestrogènes, en particulier au niveau hypothalamique et hypophysaire. Des exemples de SERM incluent le clomiphène, le tamoxifène, et le raloxifène.

Le terme "*Inhibiteur de l'Aromatase*" se réfère à tous les composés chimiques, stéroïdes et polypeptides qui bloquent l'activité d'un enzyme nommé aromatase qui convertit les androgènes en

5 oestrogènes. Des exemples d'inhibiteurs de l'aromatase incluent l'anastrozole, le létrozole et l'exémestane.

Le terme "*Inhibiteurs des Phosphodiesterase*" se réfère à tous les composés chimiques qui bloquent or inhibent les phosphodiesterases. Ces phosphodiesterases sont  
10 des enzymes inactivant les nucléotides cycliques tels que l'AMPcyclique et le GMPcyclique. Cette activité résulte en une accumulation de ces nucléotides cycliques prolongeant ainsi, dans le tissu cible, le signal induit la FSH ou la LH. Un exemple d'inhibiteur de phosphodiesterase est la théophylline.

15 La GnRH est un neuropeptide qui stimule la sécrétion de LH et FSH (les deux gonadotrophines) par la glande hypophyse. Ces deux hormones sont essentielles pour le bon fonctionnement du cycle menstruel. Des analogues synthétiques, dérivés de la structure du GnRH naturel, ont été synthétisés. Ces analogues présentent une activité de type agoniste, le plus souvent accrue par rapport au peptide naturel. Cette propriété est due  
20 à une résistance augmentée à la dégradation et à une affinité accrue pour le récepteur hypophysaire à la GnRH.

En clinique, ces agonistes du GnRH sont principalement utilisés pour diminuer la sécrétion de la LH et de la FSH par un mécanisme de désensibilisation des cellules  
25 hypophysaires qui les sécrètent. Les principales indications thérapeutiques de ces agonistes sont le cancer de la prostate, l'endométrioses, et la prévention d'une montée prématurée de la LH lors des traitements de stimulation ovarienne pour AMP (Loumaye E. 1990 The control of endogenous secretion of LH by gonadotrophin-releasing hormone agonists during ovarian hyperstimulation for in-vitro fertilization and embryo transfer. Hum  
30 Reprod. 5:357-76.). Contrastant avec le vaste usage clinique des agonistes du GnRH pour diminuer la sécrétion de LH et FSH, l'exploitation thérapeutique de leur propriété agonistique (stimulante de la sécrétion de LH et FSH) est restée extrêmement limitée à ce

jour. Dans les traitements de l'infertilité, la capacité de ces substances à provoquer une sécrétion de LH a été utilisée pour déclencher l'ovulation à mi-cycle (Lanzone, A *et al.*, 1989 LH surge induction by GnRH agonist at the time of ovulation. *Gynecol Endocrinol* 3: 213-220; Buckett W.M. *et al.*, 1998, Induction of the endogenous gonadotrophin surge for oocyte maturation with intra-nasal GnRH analogue (buserelin): effective minimal dose. *Hum Reprod* 13: 811-814, 1998; Fauser BC *et al.*, 2002, Endocrine profile after triggering of final oocyte maturation with GnRH agonist after co-treatment with the GnRH antagonist Ganirelix during ovarian hyperstimulation for *in vitro* fertilisation. *J Clin Endocrinol metab* 87: 709-715). Cependant, dans ce cas, la phase lutéale est aussi déficiente et les taux de grossesses sont bas (Fauser BC *et al.*, 2002, Endocrine profile after triggering of final oocyte maturation with GnRH agonist after co-treatment with the GnRH antagonist Ganirelix during ovarian hyperstimulation for *in vitro* fertilisation. *J Clin Endocrinol metab* 87: 709-715; Beckers *et al.*, 2002, Comparison of non-supplemented luteal phase characteristics following the administration of r-hCG, r-hLH or GnRH agonist to induce final oocyte maturation in *in vitro* fertilisation patients. *Hum. Reprod.* 17: Abstract Book 1; O-157).

Une seule tentative d'utiliser un agoniste du GnRH pour soutenir la phase lutéale a été rapportée dans la littérature médicale (Schmidt-Sarosi C. *et al.*, 1995, Ovulation triggering in clomiphene citrate-stimulated cycles: human chorionic gonadotropin versus a gonadotropin releasing hormone agonist. *J Ass. Reprod. & Genetics.* 12: 167-174). Cette tentative s'est cependant avérée être un échec comme l'a indiqué des taux sanguins anormalement bas en progestérone, une insuffisance d'imprégnation progestéronique de l'endomètre et un taux de grossesse bas.

Il faut noter qu'une diminution de la sécrétion de progestérone (via une suppression de la LH) a aussi été rapportée après administration répétée d'un agoniste du GnRH pendant la phase lutéale de cycles spontanés (Lemay *et al.*, 1982, Sensitivity of pituitary and corpus luteum responses to single intranasal administration of buserelin in normal women. *Fertil Steril* 37: 193-200 ; Lemay *et al.*, 1983, Gonadotroph and corpus luteum responses to two successive intranasal doses of a luteinising hormone-releasing hormone

agonist at different days after the mid-cycle luteinising hormone surge, Fertil Steril 39: 661-887).

5 L'ensemble des évidences disponibles à ce jour indiquent donc un effet négatif des agonistes du GnRH sur la fonction lutéale et en aucun cas un effet de support lutéal. Ainsi jusqu'à présent, les agonistes du GnRH sont considérés par l'homme de l'art, et sont essentiellement utilisés, comme agent thérapeutique adapté à diminuer la sécrétion des gonadotrophines (LH & FSH) par un mécanisme de désensibilisation, plutôt qu'à stimuler  
10 leur sécrétion.

Or la présente invention découle, en particulier, de la constatation du fait que, de façon tout à fait inattendue, l'utilisation d'un agoniste du GnRH dans la préparation d'un agent pharmaceutique pour le support de la phase lutéale lors de traitements de la stérilité  
15 chez un mammifère femelle est tout à fait possible et apporte un avantage significatif par rapport aux agents thérapeutiques actuellement utilisés pour cette indication.

Cette utilisation d'un agoniste du GnRH pour le support de la phase lutéale peut prendre place soit après une ovulation spontanée, soit après une stimulation de la croissance folliculaire, et induction de la maturation finale des follicules et d'ovulation par  
20 un ou plusieurs agents thérapeutiques. Dans ce cas précis l'agent thérapeutique induisant la maturation finale des follicules ainsi que l'ovulation pourra également être choisi parmi les agonistes du GnRH ; un autre ou, de préférence, le même agoniste du GnRH que celui utilisé pour le support de la phase lutéale.

25 Dans certains cas, une augmentation prématurée de la LH sanguine peut survenir durant la phase de stimulation de la croissance folliculaire. Ceci a un effet fort délétère sur la viabilité de l'ovocyte et peut même déclencher une ovulation prématurée, entraînant une annulation du cycle de traitement. Afin de prévenir cette montée prématurée de la LH, on pourra prévoir que l'agent pharmaceutique adapté au support de la phase lutéale est utilisé  
30 après administration d'un antagoniste du GnRH durant les derniers jours de stimulation des phases de croissance folliculaire, de maturation finale des follicules et d'ovulation et cela typiquement dès que les follicules atteignent un diamètre moyen entre 12 et 14 mm.

Si la grande majorité des patientes ont un support lutéal suffisant en recevant un agoniste du GnRH selon l'invention présentée, une minorité cependant pourront avoir des taux sériques de progestérone insuffisants, par exemple des valeurs inférieures à 10 ng/ml ou une phase lutéale trop courte, par exemple une durée inférieure à 11 jours. Dans ce cas, il est recommandé d'associer à l'agoniste du GnRH de la présente invention un autre support lutéal tel que de la progestérone naturelle, un progestatif, de l'hCG, de la LH, une ou plusieurs isoformes de l'hCG ou de la LH, des peptido-mimétiques de l'hCG ou de la LH, des dérivés de l'hCG ou de la LH à durée d'action modifiée, des inhibiteurs des phosphodiésterases ou une combinaison de deux ou plusieurs de ces agents. La combinaison avec un ou plusieurs de ces agents thérapeutiques se fera cependant à des doses moindres de celles utilisées lorsque cet agent est administré comme seul et unique support lutéal.

Selon un mode de mise en œuvre particulier de la présente invention, la croissance folliculaire est stimulée par administration d'une préparation folliculo-stimulante en début d'un cycle spontané ou après avoir induit les menstruations à l'aide d'une pillule contraceptive ou d'un progestatif. Les agents stimulant la croissance des follicules seront choisis parmi l'hMG, la FSH dérivée d'urines, la FSH recombinante, une ou plusieurs isoformes de la FSH, les mimétiques de la FSH, les dérivés de la FSH à durée d'action modifiée (ex: chimères moléculaires), les SERM, les inhibiteurs de l'aromatase, les inhibiteurs des phosphodiésterases, ou une combinaison de deux ou plusieurs de ces agents.

Les SERM peuvent, par exemple, être choisis parmi le clomiphène, le tamoxifène, ou le raloxifène ou une combinaison de deux ou plusieurs de ces agents, alors que les inhibiteurs de l'aromatase peuvent, par exemple, être choisis parmi l'anastrozole, le létrozole ou l'exemestane ou une combinaison de deux ou plusieurs de ces agents.

Egalement selon le mode de mise en œuvre susmentionné, l'utilisation d'un inhibiteur de la phosphodiésterase, tel que par exemple la théophylline, comme agent stimulant la croissance des follicules permettra d'accroître et de prolonger l'effet ovarien de la FSH endogène et/ou exogène en prévenant le catabolisme, c'est à dire la dégradation et la destruction, du second messenger de la FSH, à savoir l'AMPc cyclique. Cette

stimulation est suivie de l'induction de la maturation folliculaire finale et de l'ovulation par un ou plusieurs agents suivants : l'hCG, la LH, une ou plusieurs isoformes de l'hCG ou de la LH, des peptido-mimétiques de l'hCG ou de la LH, des dérivés de l'hCG ou de la LH à durée d'action modifiée, des inhibiteurs des phosphodiésterases ou une combinaison de deux ou plusieurs de ces agents.

Selon un autre mode de mise en oeuvre de la présente invention, la stimulation par un agent thérapeutique et l'induction de l'ovulation peuvent être suivies d'une IUI ou d'un prélèvement d'ovocytes. Ces ovocytes pourront être destinés à une maturation et à une fécondation in vitro en vue d'une ré-implantation ultérieure. Toutes les méthodes d'inséminations sont acceptables et leur choix est une décision médicale. Les rapports sexuels et l'IUI sont généralement recommandés le lendemain du déclenchement, avec répétition éventuelle le surlendemain. Pour l'IVF et l'ICSI, le prélèvement des ovocytes doit se faire dans une fourchette horaire bien précise, entre 34 et 40 heures après le déclenchement de la maturation folliculaire finale. Pour le prélèvement des ovocytes, le liquide folliculaire est aspiré à l'aide d'une aiguille guidée par échographie. Le liquide aspiré est examiné sous une loupe binoculaire pour visualiser les complexes cumulus-oocytes. Ceux-ci sont transférés dans un milieu de culture approprié et maintenu dans un incubateur assurant des conditions définies et adaptées de température, d'humidité et de gaz en vue d'une implantation ultérieure.

Selon un autre mode de mise en oeuvre de l'invention, le support lutéal par un agoniste du GnRH peut être associé à un agent thérapeutique impliqué dans l'implantation embryonnaire. En effet, si l'implantation de l'embryon nécessite un endomètre préparé par un support lutéal adéquat, il est aussi établi que d'autres facteurs telles que des cytokines jouent un rôle critique dans ce processus (Lessey BA.. The role of the endometrium during embryo implantation. Hum Reprod 2000: 15 Suppl 6:39-50). Un exemple précis est le rôle critique du Leukemia Inhibitory Factor (LIF) dans l'implantation de l'embryon (Stewart CL *et al.* Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. Nature 1992;359:76-9). Chez les patientes présentant un trouble de l'implantation lié à une déficience relative ou absolue en LIF, il est donc recommandé d'associer à l'agoniste du GnRH servant au support lutéal tel que décrit dans la présente invention,

du LIF naturel ou recombinant ou tout analogue peptidique ou non-peptidique agoniste du LIF, et/ou une autre cytokine impliquée dans les mécanismes de l'implantation.

5 L'agent pharmaceutique contenant l'agoniste du GnRH servant au support de la phase lutéale lors de traitements de la stérilité chez un mammifère femelle, en l'occurrence une femme, pourra être administré à la patiente par voie intra-nasale, orale, sous-cutanée, intramusculaire, vaginale, rectale, transdermique ou pulmonaire.

10 L'agoniste du GnRH utilisé dans la présente invention pourra être choisi parmi un GnRH natif de mammifère ou de toute autre espèce animale, ou recombinant, un peptide synthétique agoniste du GnRH, un agoniste non-peptidique du GnRH ou une chimère moléculaire du GnRH. Cette dernière molécule pourra comprendre une partie active, peptidique ou non-peptidique, du GnRH et sera obtenue par des techniques de biologie  
15 moléculaire ne posant aucune difficulté à l'homme du métier. Plus particulièrement, cet agoniste du GnRH pourra être choisi parmi le groupe de substances comprenant la buséréline, la nafaréline, la triptoréline, la leuproréline ou la gosséréline, les analogues et dérivés structurels ayant essentiellement la même activité que la GnRH, une combinaison de deux ou plusieurs de ces agonistes.

20

L'agent pharmaceutique contenant l'agoniste du GnRH servant au support de la phase lutéale lors de traitements de la stérilité sera typiquement administré dès les trois premiers jours suivant le déclenchement de l'ovulation jusqu'au moment où la grossesse sera bien établie. Préférentiellement, l'administration débutera dès le 1<sup>er</sup> jour suivant  
25 l'induction de l'ovulation.

La dose d'agoniste administrée est sujette à variation et dépendra essentiellement de l'agoniste utilisé, suivant ses caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, ainsi que la manière selon laquelle il sera administré. Selon cette invention et de manière préférentielle, l'agoniste du GnRH utilisé sera la buséréline et  
30 l'administration de choix consistera en une administration intra-nasale, en une ou plusieurs doses quotidiennes pouvant varier de 50 à 400 µg. Préférentiellement, la dose utilisée sera de 100 µg.



La fréquence d'administration de l'agoniste du GnRH durant la phase lutéale est aussi d'une importance cruciale et doit être définie pour chaque agoniste du GnRH en fonction de caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques propres à chaque agoniste et à sa formulation. Selon le mode préférentielle d'utilisation, l'agent pharmaceutique contenant la buséréline servant au support de la phase lutéale lors de traitements de la stérilité sera administré selon une fréquence de deux administrations par jour (en moyenne à 12 heures d'intervalle) à une administration tous les trois jours, mais de façon préférentielle, une administration tous les deux jours (environ toutes les 48 heures).

La durée totale d'administration de l'agoniste du GnRH devra couvrir au moins la période de pré-, péri- et post-implantation précoce de l'embryon. Après l'implantation, l'embryon va en effet assurer progressivement son propre support lutéal par la sécrétion d'hCG par les cellules de son trophoblaste. Pratiquement, cela signifie une durée d'administration de l'agoniste du GnRH de 7 à 28 jours. Préférentiellement, la durée totale d'administration de la buséréline sera de 14 jours.

La stimulation de la croissance des follicules par la FSH ou ces dérivés devra couvrir une durée moyenne de 10 jours. La réponse ovarienne à la stimulation est suivie en mesurant, par échographie, le nombre et le diamètre des follicules croissants dans les ovaires. Une méthode complémentaire pour ce suivi est la mesure des taux sanguins d'oestradiol (Shoham, 2001, Drug used for controlled ovarian stimulation: clomiphene citrate and gonadotropins. In *Textbook of Assisted Reproductive Techniques* eds D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, Z. Shoham. Martin Dunitz 2001.pp 413-424 ; Balasch, 2001, Inducing follicular development in anovulatory patients and normally ovulating women: current concepts and the role of recombinant gonadotropins. In *Textbook of Assisted Reproductive Techniques* eds D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, Z. Shoham. Martin Dunitz 2001 pp 425-446). Pour les agents agissant par stimulation de la FSH endogène, tels que les SERM et les inhibiteurs de l'aromatase, ils sont généralement administrés par voie orale pendant 1 à 7 jours en début de cycle (Fisher *et al.* 2002, A randomized double-blind comparison of the effects of clomiphene citrate and the aromatase inhibitor letrozole on ovulatory function in normal women. *Fertil Steril*

78: 280-285. ). Une troisième possibilité est d'utiliser des inhibiteurs de la phosphodiesterase qui vont accroître et prolonger l'effet ovarien de la FSH endogène et/ou exogène en prévenant le catabolisme (dégradation et destruction) du second messager de la FSH, l'AMPcycloique.

Lorsque le choix de l'agent pharmaceutique induisant la maturation folliculaire finale se porte sur l'agoniste du GnRH, de manière préférentielle celui-ci sera le même que celui utilisé pour le support de la phase lutéale. Selon cette invention et de manière préférentielle, l'agoniste du GnRH utilisé sera la buséréline et l'administration de choix consistera en une administration intra-nasale, en une seule dose pouvant varier de 50 à 600 µg. Préférentiellement, la dose utilisée sera de 200 µg.

Une des variantes de la présente invention prévoit également un conditionnement pharmaceutique adapté à une libération retardée et contrôlée de l'agoniste du GnRH tel que défini dans la présente invention. L'agoniste du GnRH pourra, par exemple, être enrobé dans une matrice support à base de polymère biocompatible permettant ainsi sa libération retardée et contrôlée. Tous les polymères biocompatibles, bien connus de l'homme du métier, seront susceptibles d'être utilisés dans cette variante de l'invention.

Un des objets de la présente invention porte également sur la mise à disposition d'un équipement de traitement communément appelé « kit », comprenant un ou plusieurs agents thérapeutiques pour déclencher la maturation folliculaire finale ainsi que l'ovulation, et un agoniste du GnRH pour le support de la phase lutéale. Préférentiellement, l'agent thérapeutique servant au déclenchement de la maturation folliculaire finale ainsi que l'ovulation sera le même que celui qui sera utilisé pour le support de la phase lutéale. Selon cette invention et de manière préférentielle, l'agoniste du GnRH utilisé sera la buséréline. Préférentiellement, l'agent thérapeutique servant au déclenchement de la maturation folliculaire finale et l'ovulation, ainsi que celui qui sera utilisé pour le support de la phase lutéale seront formulés en dosage et unité, ou multiple d'unités, couvrant un ou trois, mais préférentiellement un cycle de traitement. La composition formulée peut être incluse dans un emballage, un conditionnement ou un dispositif d'administration facilitant la prise de l'agoniste du GnRH par la patiente.

Un autre objet de la présente invention consiste en une méthode de traitement de l'infertilité par l'utilisation d'agonistes du GnRH pour le support de la phase lutéale. Cette méthode comprend les phases suivantes :

5

- a) stimulation des phases de croissance folliculaire, de maturation finale des follicules et d'ovulation par un ou plusieurs agents thérapeutiques,
- b) utilisation d'un agent pharmaceutique agoniste du GnRH pour le support de la phase lutéale tel que défini précédemment lors de l'exposé des différentes variantes de l'invention.

10

La présente invention ainsi que les variantes sont illustrées par les exemples non limitatifs suivants :

15 Exemple 1

Les patientes souffrant de stérilité inexpiquée, ou de stérilité résultant d'une endométriose légère ou modérée, ou encore de stérilité résultant d'une altération légère ou modérée du sperme du conjoint, et qui n'ont pas conçu malgré des rapports sexuels réguliers pendant une période de une à deux années, sont généralement prises en charge médicalement. Le traitement le plus souvent utilisé est la stimulation ovarienne associée à une IUI (Hughes G.H. 1997, The effectiveness of ovulation induction and intra-uterine insemination in the treatment of persistent infertility: a meta-analysis. Hum Reprod. 12: 1865-1872). Ce cycle de traitement sera éventuellement précédé de la prise d'une pilule contraceptive pour induire des règles et mieux programmer le traitement. Aux jours 2 à 5 des menstruations, la patiente commencera la prise soit de citrate de clomiphène soit d'un inhibiteur de l'aromatase ou encore de FSH. Le citrate de clomiphène sera administré par voie orale une fois par jour du 3ème au 7ème jour à une dose quotidienne de 50 à 250 mg/jour. Un inhibiteur de l'aromatase tel que le létrozole sera pris pour une durée variant entre 1 à 7 jours, à une dose quotidienne de 0.5 à 10 mg/jour. La FSH sera administrée par voie sous-cutanée ou intra-musculaire à partir du jour 2 ou 3 des menstruations, pour une durée de 5 à 12 jours, à une dose quotidienne de 37.5 à 150 UI/jour.

20

25

30

Quelque soit la médication utilisée pour la stimulation de la croissance folliculaire, la réponse ovarienne sera suivie de façon régulière par échographie trans-vaginale et par la mesure du taux sanguin d'oestradiol. Typiquement, un premier control sera réalisé au 6ème  
5 jour de la stimulation. Le nombre et la taille des follicules en croissance seront notés. La concentration sanguine en oestradiol sera mesurée par une méthode appropriée et validée, le plus souvent une méthode RIA, IRMA or ELISA.

Lorsque au moins un, et au maximum trois follicules auront atteint un diamètre moyen de  
10 16 mm ou plus, et que le taux sanguin d'oestradiol n'indique pas de risque significatif de syndrome d'hyperstimulation ovarienne (oestradiol sanguin < 1500 pg/ml), la patiente recevra une administration d'agoniste du GnRH pour déclencher l'ovulation. Elle recevra pour cela une dose entre 50 et 600 µg de buséréline par voie intra-nasale, la dose préférée étant de 200 µg.

15 Douze à 48 heures après le déclenchement de l'ovulation, le partenaire de la patiente fournira un échantillon de sperme, et ce de préférence après une abstinence de 2 à 5 jours. Les spermatozoïdes mobiles seront séparés du liquide séminal, des spermatozoïdes morts, des leucocytes et des débris cellulaires par une méthode appropriée telle qu'une méthode de "swim-up" ou un gradient de percol. Ce même jour, la suspension de spermatozoïdes  
20 mobiles sera utilisée pour une insémination intra-utérine de la patiente par cathétérisation de l'utérus via le col utérin. Cette procédure pourra être répétée le lendemain.

A partir de ce jour, et pour une durée de 14 jours, la patiente recevra entre trois fois par jour et une fois tous les 3 jours (préférentiellement une fois tous les deux jours), une administration intra-nasale de 50 à 400 µg de buséréline, préférentiellement 100 µg. Ces  
25 administrations de buséréline seront effectuées par la patiente elle-même. Ces administrations, par spray nasal, prennent moins d'une minute, ne nécessitent pas de préparation, ni de matériel spécial et ne présentent aucun risque de réaction locale tel que douleurs ou abcès.

30 Au 13ème jour après le déclenchement de l'ovulation, un test de grossesse sera effectué en mesurant la concentration en hCG dans les urines ou le sang de la patiente. Un test hCG positif indiquera de façon indiscutable que la patiente est enceinte puisque il n'aura pas eu d'administration exogène d'hCG.

Exemple 2

Les patientes de l'exemple 1 qui ne seraient pas enceintes après 3 à 6 cycles de IUI se  
5 verront proposer un traitement par IVF ou ICSI. Ces traitements seront proposés d'emblée  
aux patientes dont la cause de la stérilité est un problème tubaire sévère, ou une  
endométriiose sévère ou encore une altération sévère du sperme du conjoint.

La patiente peut être traitée avant son cycle d'IVF ou d'ICSI avec une pilule contraceptive  
pour programmer la date exacte des menstruations. Ceci est fait dans le but de mieux gérer  
10 le temps du couple et du centre clinique effectuant l'AMP. Lorsque les menstruations  
surviennent, une stimulation ovarienne sera effectuée par FSH à une dose variant entre 75  
et 600 UI par jour en fonction des caractéristiques de la patiente (ex: age, status ovarien,  
poids, etc...). Le traitement peut se faire par FSH seule mais la FSH peut aussi être  
supplémentée par le citrate de clomiphène ou un inhibiteur de l'aromatase. Cinq à 7 jours  
15 après le début de la stimulation, ou lorsque les follicules les plus grands atteignent un  
diamètre de 14 mm, un antagoniste du GnRH sera administré pour prévenir la survenue  
d'une montée prématurée de la LH dans le sang. La croissance folliculaire sera suivie par  
échographie transvaginale et par la mesure des taux sanguins en oestradiol. Ces contrôles  
seront effectués tous les 2 à 3 jours.

20

Lorsque au moins deux follicules auront atteint un diamètre de 16 mm ou plus, que le  
nombre total de follicules n'excèdera pas 25 à 30, et que le taux sanguin d'oestradiol  
n'indiquera pas un risque excessif de syndrome d'hyperstimulation ovarienne  
(concentration d'oestradiol  $< 4000$  pg/ml), la patiente recevra une administration  
25 d'agoniste du GnRH pour déclencher la maturation folliculaire finale. Elle recevra pour  
cela une dose entre 50 et 600 µg de buséréline par voie intra-nasale, la dose préférée étant  
de 200 µg. Le moment d'administration de la buséréline sera précis car il déterminera  
le moment de la procédure d'aspiration des ovocytes qui doit se faire entre 35 et 38 heures  
après le déclenchement.

30

Au deuxième jour après la première administration de l'agoniste du GnRH, la patiente sera admise dans l'unité clinique d'AMP pour la procédure de prélèvement des ovocytes. Les ovocytes seront récoltés par aspiration transvaginale, échoguidée des follicules. Cette procédure est généralement effectuée sous anesthésie légère. Les liquides folliculaires aspirés seront examinés à la loupe binoculaire pour identifier les complexes cumulus-ovocytes. Ces derniers seront transférés dans un milieu de culture adéquat et conservés dans des conditions appropriées de température, de gaz et d'humidité. Quelques heures après la récolte, les ovocytes seront inséminés soit par co-incubation avec une suspension de spermatozoïdes mobiles soit par injection par micro-manipulation d'un spermatozoïde dans le cytoplasme. La patiente quittera le centre d'AMP ce même jour.

A partir du jour précédant la récolte ovocytaire, et pour une durée de 14 jours, la patiente recevra entre trois fois par jour et une fois tout les 3 jours (préférentiellement une fois tous les deux jours), une administration intra-nasale de 50 à 400 µg de buséréline, préférentiellement 100 µg. Ces administrations de buséréline seront effectuées par la patiente elle-même. Ces administrations, par spray nasal, prennent moins d'une minute, ne nécessitent pas de préparation, ni de matériel spécial et ne présentent aucun risque de réaction locale tels que douleurs ou abcès.

Le lendemain de l'insémination, la fertilisation des ovocytes sera évaluée par visualisation au microscope de la présence de deux pronuclei dans leur cytoplasme. Les premiers stades de clivages de l'embryon seront observés dans les 48 heures suivantes. Le remplacement dans l'utérus des embryons sera généralement effectué au troisième jour après le prélèvement des ovocytes ou plus tard si la culture des embryons est poursuivie jusqu'au stade de blastocyste. Le plus souvent 2 embryons seront remplacés si la patiente a moins de 35 ans, et trois embryons si la patiente est âgée de plus de 35 ans.

Au 13ème jour après le déclenchement de la maturation folliculaire finale, un test de grossesse sera effectué en mesurant la concentration en hCG dans les urines ou le sang de la patiente. Un test hCG positif indiquera de façon indiscutable que la patiente est enceinte puisque il n'aura pas eu d'administration exogène d'hCG.

## Revendications

1. Utilisation d'un agoniste d'une hormone hypothalamique dans la préparation d'un agent pharmaceutique pour le traitement de la stérilité chez un mammifère femelle caractérisée en ce que ledit agoniste est un agoniste du GnRH et en ce que l'agent pharmaceutique est adapté à une utilisation pour le support de la phase lutéale.
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'agent pharmaceutique est adapté à une utilisation pour le support de la phase lutéale après ovulation spontanée.
3. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'agent pharmaceutique est adapté à une utilisation pour le support de la phase lutéale après stimulation des phases de croissance folliculaire, de maturation finale des follicules et d'ovulation par un ou plusieurs agents thérapeutiques.
4. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'agent thérapeutique induisant la maturation finale des follicules et l'ovulation est un agoniste du GnRH.
5. Utilisation selon les revendications 3 et 4, caractérisée en ce que l'agent thérapeutique induisant la maturation finale des follicules et l'ovulation est le même agoniste du GnRH que celui utilisé pour le support de la phase lutéale.
6. Utilisation selon les revendications 3 et 4, caractérisée en ce que l'agent thérapeutique induisant la maturation finale des follicules et l'ovulation est un agoniste du GnRH différent de celui utilisé pour le support lutéal.
7. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'agent pharmaceutique adapté au support de la phase lutéale est utilisé après administration d'un antagoniste du GnRH durant les derniers jours de stimulation de la phase de croissance folliculaire.
8. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'agent thérapeutique adapté au support de la phase lutéale est administré en

combinaison avec de la progestérone naturelle, un progestatif, de l'hCG, un analogue agoniste de l'hCG, de la LH, un analogue agoniste de la LH, ou un modulateur non-polypeptidique de l'AMP cyclique.

- 5 9. Utilisation selon les revendications 1 à 7, caractérisée en ce que l'agent thérapeutique adapté au support de la phase lutéale est administré en combinaison avec une cytokine impliquée dans les mécanismes de l'implantation de l'embryon.
- 10 10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que la cytokine est du LIF naturel, du LIF recombinant, un analogue peptidique ou non-peptidique agoniste du LIF.
11. Utilisation selon les revendications 1 à 10, caractérisée en ce que la stimulation par un agent thérapeutique est suivie, avant ovulation, d'un prélèvement d'ovocytes.
- 15 12. Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que les ovocytes sont destinés à une maturation in vitro.
13. Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que les ovocytes sont destinés à une fécondation in vitro.
- 20 14. Utilisation selon les revendications 1 à 10, caractérisée en ce que la stimulation par un agent thérapeutique est suivie, après induction de l'ovulation, d'une insémination (IUI).
15. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en  
25 ce que l'agoniste du GnRH est administré par voie intranasale, orale, sous-cutanée, intramusculaire, vaginale, rectale, transdermique ou pulmonaire.
16. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en  
30 ce que l'agoniste du GnRH est un GnRH naturel, un GnRH recombinant, un peptide synthétique agoniste du GnRH, un agoniste non-peptidique du GnRH ou une chimère moléculaire du GnRH.



17. Utilisation selon la revendication 16, caractérisée en ce que l'agoniste GnRH est choisi parmi le groupe comprenant la buséréline, la nafaréline, la triptoréline, la leuproréline et la gosséréline ou une combinaison de deux ou plusieurs de ces agonistes.
- 5 18. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'agent thérapeutique stimulant la croissance folliculaire est sélectionné parmi le groupe comprenant l'hMG, la FSH dérivée d'urines, la FSH recombinante, une ou plusieurs isoformes de FSH, les mimétiques de la FSH, les dérivés de la FSH à durée d'action modifiée, les SERM, les inhibiteurs de l'aromatase, les inhibiteurs des phosphodiésterases ou une combinaison de  
10 deux ou plusieurs de ces agents.
19. Utilisation selon la revendication 18, caractérisée en ce que les SERM sont choisis parmi le clomiphène, le tamoxifène, ou le raloxifène ou une combinaison de deux ou plusieurs de ces agents.
- 15 20. Utilisation selon la revendication 18, caractérisée en ce que l'inhibiteur de l'aromatase est choisi parmi l'anastrozole, le létrozole ou l'exemestane ou une combinaison de deux ou plusieurs de ces agents.
- 20 21. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'agent thérapeutique induisant la maturation finale et l'ovulation est sélectionné parmi le groupe comprenant l'hCG, la LH, une ou plusieurs isoformes de l'hCG ou de la LH, des peptido-mimétiques de l'hCG ou de la LH, des dérivés de l'hCG ou de la LH à durée d'action modifiée, des inhibiteurs des phosphodiésterases ou une combinaison de deux ou plusieurs de ces agents.
- 25 22. Utilisation selon les revendications 18 ou 21, caractérisée en ce que l'inhibiteur de phosphodiésterase est la théophylline.
23. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en  
30 ce que le mammifère femelle est une femme.
24. Utilisation selon la revendication 17, caractérisée en ce que l'agoniste GnRH est la buséréline.

25. Utilisation selon la revendication 24, caractérisée en ce que la buséréline est utilisée dès les trois premiers jours suivant l'induction de l'ovulation.
- 5 26. Utilisation selon la revendication 25, caractérisée en ce que la buséréline est utilisée dès le premier jour suivant l'induction de l'ovulation.
27. Utilisation selon les revendications 24, 25 et 26 caractérisée en ce que la buséréline est utilisée à une dose d'environ 50 à 400 µg par voie intra-nasale.
- 10 28. Utilisation selon la revendication 27, caractérisée en ce que la buséréline est utilisée à une dose de 100 µg par voie intra-nasale.
29. Utilisation selon la revendication 28, caractérisée en ce que la buséréline est  
15 utilisée à une fréquence de trois administrations par jour à une administration tous les 3 jours.
30. Utilisation selon la revendication 29, caractérisée en ce que la buséréline est utilisée à une fréquence d'une administration par jour tous les 2 jours.
- 20 31. Utilisation selon la revendication 29, caractérisée en ce que la buséréline est utilisée pendant 7 à 28 jours.
32. Utilisation selon la revendication 29, caractérisée en ce que la buséréline est  
25 utilisée pendant 14 jours.
33. Utilisation selon les revendications 4, 5 et 6, caractérisée en ce que l'agoniste du GnRH est la buséréline et est utilisée, une seule fois, à une dose d'environ 50 à 600 µg par voie intra-nasale.
- 30 34. Utilisation selon la revendication 33, caractérisée en ce que la buséréline est utilisée à une dose de 200 µg par voie intra-nasale.

35. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'agent pharmaceutique est enrobé dans une matrice support à base de polymère biocompatible permettant ainsi sa libération retardée et contrôlée.

5 36. Equipement de traitement pour le traitement de la stérilité chez un mammifère femelle, qui comprend :

- un agoniste du GnRH selon la revendication 1,
- un ou plusieurs agents thérapeutiques pour déclencher la maturation folliculaire finale ainsi que l'ovulation selon les revendications 4, 5, 6, 17 et 21.

10

37. Equipement de traitement selon la revendication 36, caractérisé en ce que l'agent thérapeutique est également l'agoniste du GnRH utilisé pour le support de la phase lutéale et que ledit agoniste du GnRH sera formulé en dosage et unité couvrant un cycle de traitement.

15

38. Procédé de traitement de la stérilité chez un mammifère femelle caractérisé en ce qu'il utilise un agent pharmaceutique comprenant un agoniste du GnRH adapté à une utilisation pour le support de la phase lutéale.

20 39. Procédé selon la revendication 38, caractérisé en ce que l'agent pharmaceutique est adapté à une utilisation pour le support de la phase lutéale après ovulation spontanée.

40. Procédé selon la revendication 38, caractérisé en ce que l'agent pharmaceutique est adapté à une utilisation pour le support de la phase lutéale après stimulation des phases de  
25 croissance folliculaire, de maturation finale des follicules et d'ovulation par un ou plusieurs agents thérapeutiques.

41. Procédé selon la revendication 40, caractérisé en ce que l'agent thérapeutique induisant la maturation finale des follicules et l'ovulation est un agoniste du GnRH.

30

42. Procédé selon les revendications 40 et 41, caractérisé en ce que l'agent thérapeutique induisant la maturation finale des follicules et l'ovulation est le même agoniste du GnRH que celui utilisé pour le support de la phase lutéale.

5 43. Procédé selon les revendications 40 et 41, caractérisé en ce que l'agent thérapeutique induisant la maturation finale des follicules et l'ovulation est un agoniste du GnRH différent de celui utilisé pour le support lutéal.

10 44. Procédé selon la revendication 40, caractérisé en ce que l'agent pharmaceutique adapté au support de la phase lutéale est utilisé après administration d'un antagoniste du GnRH durant les derniers jours de stimulation des phases de croissance folliculaire.

15 45. Procédé selon les revendications 38 à 44, caractérisé en ce que l'agent thérapeutique adapté au support de la phase lutéale est administré en combinaison avec de la progestérone naturelle, un progestatif, de l'hCG, un analogue agoniste de l'hCG, de la LH, un analogue agoniste de la LH, ou un modulateur non-polypeptidique de l'AMP cyclique.

20 46. Procédé selon les revendications 38 à 44, caractérisé en ce que l'agent thérapeutique adapté au support de la phase lutéale est administré en combinaison avec une cytokine impliquée dans les mécanismes de l'implantation.

25 47. Procédé selon la revendication 46, caractérisé en ce que la cytokine est du LIF naturel, du LIF recombinant, un analogue peptidique ou non-peptidique agoniste du LIF.

48. Procédé selon les revendications 46 et 47, caractérisé en ce que la stimulation par un agent thérapeutique est suivie, avant ovulation, d'un prélèvement d'ovocytes.

30 49. Procédé selon la revendication 48, caractérisé en ce que les ovocytes sont destinés à une maturation in vitro.

50. Procédé selon la revendication 48, caractérisé en ce que les ovocytes sont destinés à une fécondation in vitro.

51. Procédé selon les revendications 38 à 52, caractérisé en ce que l'agoniste du GnRH est administré par voie intranasale, orale, sous-cutanée, intramusculaire, vaginale, rectale, transdermique ou pulmonaire.
- 5 52. Procédé selon les revendications 38 à 51, caractérisée en ce que l'agoniste du GnRH est un GnRH naturel, un GnRH recombinant, un peptide synthétique agoniste du GnRH, un agoniste non-peptidique du GnRH ou une chimère moléculaire du GnRH.
- 10 53. Procédé selon la revendication 52, caractérisé en ce que l'agoniste GnRH est choisi parmi le groupe comprenant la buséréline, la nafaréline, la triptoréline, la leuproréline et la gosséréline ou une combinaison de deux ou plusieurs de ces agonistes.
- 15 54. Procédé selon la revendication 40, caractérisé en ce que l'agent thérapeutique stimulant la croissance folliculaire est sélectionné parmi le groupe comprenant l'hMG, la FSH dérivée d'urines, la FSH recombinante, une ou plusieurs isoformes de FSH, les mimétiques de la FSH, les dérivés de la FSH à durée d'action modifiée, les SERM, les inhibiteurs de l'aromatase, les inhibiteurs des phosphodiésterases ou une combinaison de deux ou plusieurs de ces agents.
- 20 55. Procédé selon la revendication 54, caractérisé en ce que les SERM sont choisis parmi le clomiphène, le tamoxifène, ou le raloxifène ou une combinaison de deux ou plusieurs de ces agents.
- 25 56. Procédé selon la revendication 55, caractérisé en ce que l'inhibiteur de l'aromatase est choisi parmi l'anastrozole, le létrozole ou l'exemestane ou une combinaison de deux ou plusieurs de ces agents.
- 30 57. Utilisation selon la revendication 40, caractérisée en ce que l'agent thérapeutique induisant la maturation finale et l'ovulation est sélectionné parmi le groupe comprenant l'hCG, la LH, une ou plusieurs isoformes de l'hCG ou de la LH, des peptido-mimétiques de l'hCG ou de la LH, des dérivés de l'hCG ou de la LH à durée d'action modifiée, des inhibiteurs des phosphodiésterases ou une combinaison de deux ou plusieurs de ces agents.

58. Procédé selon les revendications 54 et 57, caractérisé en ce que l'inhibiteur de phosphodiesterase est la théophylline.

5 59. Procédé selon la revendication 36, caractérisé en ce que le mammifère femelle est une femme.

60. Procédé selon la revendication 53, caractérisé en ce que l'agoniste GnRH est la buséréline.

10 61. Procédé selon la revendication 61, caractérisé en ce que la buséréline est utilisée dès les trois premiers jours suivant l'induction de l'ovulation.

15 62. Procédé selon la revendication 60, caractérisé en ce que la buséréline est utilisée dès le premier jour suivant l'induction de l'ovulation.

63. Procédé selon les revendications 59, 60 et 61 caractérisé en ce que la buséréline est utilisée à une dose d'environ 50 à 400 µg par voie intra-nasale.

20 64. Procédé selon la revendication 62, caractérisé en ce que la buséréline est utilisée à une dose de 100 µg par voie intra-nasale.

65. Procédé selon la revendication 63, caractérisé en ce que la buséréline est utilisée à une fréquence de trois administrations par jour à une administration tous les 3 jours.

25 66. Procédé selon la revendication 64, caractérisé en ce que la buséréline est utilisée à une fréquence d'une administration par jour tous les 2 jours.

30 67. Procédé selon la revendication 65, caractérisé en ce que la buséréline est utilisée pendant 7 à 28 jours.

68. Procédé selon la revendication 66, caractérisé en ce que la buséréline est utilisée pendant 14 jours.

69. Procédé selon la revendication 59, caractérisée en ce que l'agoniste du GnRH est la buséréline et est utilisée, une seule fois, à une dose d'environ 50 à 600  $\mu\text{g}$  par voie intra-nasale.
- 5 70. Procédé selon la revendication 68, caractérisé en ce que la buséréline est utilisée à une dose de 200  $\mu\text{g}$  par voie intra-nasale.
71. Procédé selon la revendication 38, caractérisé en ce que l'agent pharmaceutique est enrobé dans une matrice support à base de polymère biocompatible permettant ainsi sa
- 10 libération retardée et contrôlée.